

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

**Untersuchungen zur Prävalenz von humanen Papillomviren bei
Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx mit einer Breitspektrum - PCR**

**Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

**Vorgelegt von
Friederike Cornelia Erna Natalia von Winterfeld
aus Georgsmarienhütte
2004**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel
1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. M. Fischer
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Lu

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2004

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auszugsweise veröffentlicht in:

Fischer M., von Winterfeld F. (2003): Evaluation and Application of a broad-spectrum polymerase chain reaction assay for human papillomaviruses the screening of squamous cell tumours of the head and neck.
Acta Otolaryngol 123, 752-758.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Historie.....	6
1.2 Grundlagen	8
1.2.1 Humane Papillomviren.....	8
1.2.2 Methoden.....	9
1.2.2.1 In-situ-Hybridisierung	10
1.2.2.2 Southern-Blot-Hybridisierung	10
1.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	10
1.3 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Patienten und Tumore	14
2.2 DNA-Extraktion	15
2.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.3.1 PCR-Primer und Kontrollen	16
2.3.2 PCR-Amplifikation.....	17
2.3.3 Gelelektrophorese	19
2.4 Sequenzierung.....	20
2.4.1 Probenansatz.....	20
2.4.2 Sequenzierreaktion.....	20
2.4.3 Gelelektrophorese	21
2.4.4 Transfer der DNA.....	22

2.4.5	Chemilumineszenz-Reaktion	22
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Tumorlokalisation.....	25
3.2	Tumorstadium	26
3.3	Histologie	26
3.4	Zeitpunkt der Biopsie	27
3.5	Primer	27
3.6	Ergebnisse der Sequenzanalyse	28
4	Diskussion.....	30
4.1	Methodenvergleich.....	30
4.2	HPV in Oropharynxkarzinomen	33
4.3	Kritik.....	34
4.3.1	Probengewinnung.....	34
4.3.2	Probenanzahl und Zusammensetzung	34
4.3.3	HPV-Typisierung.....	35
4.4	Ausblick	36
5	Zusammenfassung	37
6	Literaturverzeichnis.....	38
7	Anhang.....	47
8	Danksagung	49
9	Lebenslauf.....	50

1 Einleitung

In zahlreichen Studien der letzten Jahrzehnte ist die Bedeutung der heterogenen DNA-Virengruppe der humanen Papillomviren für die Karzinogenese von epithelialen Tumoren untersucht worden. Zu nennen sind Übersichtsarbeiten von Kleinsasser und Gissmann (Kleinsasser, 1963; Gissmann et al., 1982) über Papillome als fakultative Präkanzerosen des Kehlkopfes und der Mundschleimhaut, oder von Morgan und Steinberg über den Nachweis einer Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) bei histologisch gesicherten Karzinomen (Morgan et al., 1991; Steinberg und Auborn, 1993).

Gestützt auf histologische Untersuchungen wendete sich das Interesse verschiedener Fachgruppen auch Untersuchungen an Tumoren des Anogenitaltraktes sowie maligner epithelialer Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich zu. Auslöser war der übereinstimmende Nachweis in diesen Regionen der für eine HPV-Infektion typischen morphologischen Veränderung, der Koilozytose (de Villiers, 1998).

1.1 Historie

Ende des 19. Jahrhunderts wurde die infektiöse Genese von Hautwarzen entdeckt. Zunächst an Tieren nachgewiesen (McFadyean und Hobday, 1898), bestätigte dies 1907 der Italiener G. Ciuffo durch einen Selbstversuch, indem er durch Übertragung von extrahiertem Hautwarzenmaterial an sich selbst ein Warzenwachstum beobachten konnte (Ciuffo, 1907). Weitere Versuche erfolgten von Shope 1933. Ihm gelang der Nachweis der Übertragbarkeit einer Papillomatose, jedoch noch ohne Virusnachweis. Bei dieser von ihm an Kaninchen beschriebenen Hauterkrankung kommt es zu generalisiertem Warzenwachstum mit gehäuftem Auftreten maligner epithelialer Tumoren (Shope, 1933; Syverton, 1935). Diese Versuche gelten als erstes Modell für die Analyse der Karzinomentwicklung aus gutartigen papillomatösen Hautveränderungen. Auf diesen Zusammenhang wurde erstmals in einer Veröffentlichung von Balo 1936 hingewiesen (zur Hausen, 1994). Der erste Virusnachweis gelang 1949 mit Hilfe der

Elektronenmikroskopie (Strauss, 1949). 1960 beschrieben Ito und Evans die Karzinomentwicklung im Bereich der Schleimhäute bei Kaninchen nach Transfer von gereinigter Virus-DNA und lieferten einen ersten Beweis für eine karzinogene Wirkung der humanen Papillomviren (zur Hausen und de Villiers, 1994). Im Weiteren waren Beobachtungen an Patienten mit Epidermodysplasia verruciformis von Interesse. Diese 1922 erstmals beschriebene seltene, familiär gehäuft auftretende Erkrankung ist gekennzeichnet durch ausgedehntes Warzenwachstum vor allem an lichtexponierten Körperpartien mit maligner Entartung. Als ursächlich wird ein genetischer Defekt der zellulären Immunantwort und damit einhergehender Abwehrschwäche angenommen. Der Krankheitsbeginn liegt schon im Kindesalter (Lewandowsky und Lutz, 1922).

Seit Anfang der sechziger Jahre ist das Genom des doppelsträngigen DNA-Moleküls bekannt (zur Hausen, 1994). Die erste Isolierung und Typisierung eines humanen Papillomvirus gelang zehn Jahre später aus einer Schleimhautläsion des Genitaltraktes (zur Hausen, 1977). Voraussetzung für diese Ergebnisse waren wichtige methodische Innovationen im Bereich der Molekularbiologie. Der entscheidende Fortschritt gelang mit der Einführung der Polymerase-Kettenreaktion 1983 (Saiki et al., 1988). Nachdem Untersuchungen die Assoziation einer Infektion mit humanen Papillomviren (vor allem HPV-Typen 6 und 11) und dem Entstehen einer Larynxpapillomatose aufzeigten (Mounts et al., 1982), konnten auch Erkenntnisse von anogenitalen Tumoren auf die Kopfhals-Region übertragen werden. Als Grundlage dienten Beobachtungen an Kindern mit einer Larynxpapillomatose und der wahrscheinlich perinatalen HPV-Infektion bei mütterlichen Kondylomen (Bradford et al., 1991; Clayman et al., 1994).

Mit weiteren Studien gelang auch in diesem Bereich der Virusnachweis bei typischerweise oft klinisch inapparent verlaufenden Infektionen (Alani und Münger, 1998; Beutner und Tyring, 1997). Inzwischen sind die humanen Papillomviren bei gesicherter pathogenetischer Rolle bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Zervix 1995 offiziell als Karzinogen für das Zervixkarzinom klassifiziert worden (IARC, 1995).

1.2 Grundlagen

1.2.1 Humane Papillomviren

Humane Papillomviren gehören zu der Familie der Papovaviridae. Diese Bezeichnung steht für Papillom-Polyom-vakuolisierende Viren. Sie sind wirtsspezifisch und werden deshalb unterteilt in humane-, Rinder-, Kaninchen- usw. Papillomviren. Diese Viren infizieren ausschließlich Epithelzellen. Diese Infektion erfolgt speziesspezifisch bei bevorzugten Epithelien. Je nach der entsprechenden Präferenz unterscheidet man Haut- und Schleimhauttypen.

Mit 45-55 nm Durchmesser gehören sie zur Gruppe der kleinen DNA-Viren. Ihr Genom umfasst etwa 7800-8000 Nukleotidbasenpaare. Es liegt typischerweise als DNA-Ringmolekül vor. Das Genom wird in „frühe“ („early“/ E) und „späte“ („late“/ L) Gene, bzw. sogenannte Leseraster („open reading frames“ [ORFs]) unterteilt. Diese Bezeichnung resultiert aus dem Replikationszeitpunkt im Zellzyklus. Die meist sieben bis acht „frühen“ Gene kodieren vor allem die für die Virusreplikation notwendigen Proteine, während auf den „späten“ Genen (L1 und L2) die Informationen für die sogenannten Kapsidproteine liegen. Von besonderem Interesse sind E6, E7 und L1. Diese weisen geringe Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen HPV-Typen auf und werden als „konserviert“ bezeichnet. Die Sequenzfolge dieser Gene wird zur Beschreibung neuer Virustypen herangezogen (Pfister und Fuchs, 1987). Nach heutiger Definition wird ein HPV-Typ als neu klassifiziert, wenn zu einem bekannten HPV-Typ in den Regionen E6, E7 und L1 ein Homologiegrad von weniger als 90 % vorliegt. Das bedeutet, dass mehr als 10 % der Basenfolge differieren (Chan et al., 1995). Dank technischer Entwicklungen der letzten Jahre und der Erkenntnisse über die große Typenvielfalt dieser Virenfamilie ist diese Grenze zunehmend enger gefasst worden. Bis jetzt sind über 80 verschiedene Typen klassifiziert und nach Pathogenitätsgraden eingeteilt. Außerdem liegen zahlreiche HPV-DNA-Isolate vor, die noch weiter charakterisiert werden müssen und unter Umständen neuen Typen entsprechen. Mit den Fortschritten dieses Nachweises erfolgte auch die Möglichkeit der genaueren Einteilung und Zuweisung der verschiedenen Virustypen zu bestimmten Läsionen und Gewebelokalisationen und

der Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung. Nach dem Grad der Übereinstimmung der Basensequenzfolgen können Gruppen gebildet werden. Abhängig vom Vorkommen in malignen Veränderungen unterteilt man die Schleimhauttypen in „high-risk“- oder „low-risk“-Typen (Gillison et al., 1999).

Aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Karzinomentwicklung im Bereich der Haut wurde das seltene Krankheitsbild der schon erwähnten Epidermodysplasia verruciformis (E.V.) auch im Rahmen der HPV-Forschung interessant. Es gelang der Nachweis einer bestimmten Gruppe von Viren, die als E.V. HPV-Typen klassifiziert wurden (de Villiers, 1991). Somit war ein Zusammenhang zwischen HPV und Plattenepithelkarzinomen der Haut hergestellt. Histomorphologisch lässt sich eine HPV-Infektion v.a. in den basalen Zellschichten des Epithels nachweisen, wo sie auch als latente Infektion auf Dauer persistieren kann (Viac et al., 1978).

Nach intensiven Untersuchungen des pathogenetischen Zusammenhanges der Virusinfektion bei anogenitalen Schleimhautläsionen, kann man als Beispiel für die „low-risk“-Typen HPV 6 und 11 benennen. Diese kommen vor allem bei Zervixkondylomen vor, während HPV 16 und 18, aus der „high-risk“-Gruppe, in der weit überwiegenden Mehrheit der Zervixkarzinome nachweisbar sind (zur Hausen, 1998). Im Kopf-Hals-Bereich gilt die Larynxpapillomatose als typisches benignes Erkrankungsbild einer HPV-Infektion. In über 90% aller Larynxpapillome gelingt der Nachweis einer Infektion mit HPV 6 oder 11. Als wahrscheinlichen Übertragungsweg wird eine Infektion des Kindes während der Geburt angenommen, bei klinisch manifester oder subklinischer Infektion der Mutter (zur Hausen, 1989).

Für die Karzinogenese von Interesse ist die Wirkung der Gene E6 und E7. Normalerweise dienen diese Gene der Kontrolle der Virusaktivität und verringern das Risiko von Neumutationen und unkoordinierter Proliferation. Experimentell konnte der entscheidende Einfluss dieser beiden Gene auf eine maligne Entartung der Zellen nachgewiesen werden. Das E7-Protein bindet das Genprodukt des Retinoblastomagens (Rb), ein Tumorsuppressorgen. Somit hat E7 Einfluss auf die Zellproliferation und kann diese erhöhen. Das E6-Protein bewirkt über Kontakt mit dem Tumorsuppressorgen p53 einen Wachstumsstillstand und eine Blockade der DNA-Reparatur (Munger et al., 1989).

1.2.2 Methoden

Zwischen der Erstbeschreibung und den genannten Erkenntnissen des Virusvorkommens lagen Jahrzehnte der Stagnation. Ausgehend von histologischen Untersuchungen mit dem typischen Befund der Koilozytose und Parakeratose bei HPV-positiven Epithelgeweben (Steinberg und DiLorenzo, 1996), war eine gezielte Suche bei dem nur mäßigen Erfolg der herkömmlichen Verfahren über lange Zeit nicht möglich. Versuche HPV in Zellkulturen anzuzüchten, misslangen bisher.

1.2.2.1 In-situ-Hybridisierung

Ausgehend von vorrangegangenen molekulargenetischen Entwicklungen Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts, wie Restriktionsenzyme und Klonierungstechniken von DNA-Bruchstücken, entstanden verschiedene Untersuchungsansätze. Zu den wichtigsten zählt die In-situ-Hybridisierung. In dem zu untersuchenden Gewebe wird Einzelstrang-DNA erzeugt und mit einer markierten DNA-Sonde inkubiert. Bei zwar relativ niedriger Sensitivität bietet dieses Verfahren den Vorteil der Unterscheidung zwischen integrierter und episomaler Virus-DNA (Cerovac et al., 1996).

1.2.2.2 Southern-Blot-Hybridisierung

Im Gegensatz zur In-situ-Hybridisierung bleibt bei der Southern-Blot-Hybridisierung die Gewebemorphologie nicht erhalten. Bevor die zelluläre DNA, nach Extraktion, mit einer markierten HPV-Sonde inkubiert wird, ist sie durch Restriktionsenzyme geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt worden. Die Sensitivität liegt bei 0,1-0,01 Genomkopien je Zelle. Wenn auch als Screeningmethode zu aufwendig und nicht ausreichend effizient, wird diese Methode als Goldstandard der HPV-Diagnostik angesehen. Die Unterscheidungsmöglichkeit in integrierte oder episomale Virus-DNA ist ebenfalls möglich (de Villiers, 1993).

1.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion war ein einfaches, effizientes und sensitives Nachweisverfahren gefunden. Auch unter weniger stringentem Versuchsaufbau kann die Vervielfältigung fast automatisiert erfolgen. Die Sensitivität liegt mit einer Genomkopie pro 100000 Zellen extrem hoch. Dies ließ das Interesse an humanen Papillomviren und die Forschungsintensität zunehmen. Voraussetzung für die Versuchsdurchführung sind Kenntnisse über das zu untersuchende Genom, was den allgemeinen Aufbau und Basensequenzfolge angeht (Maniatis et al., 1982; Labitzke, 1991; Fliss et al., 1994). Darauf aufbauend werden zwei passende Oligonukleotide hergestellt (sogenannte „Primer“), die die gewünschte Basensequenz erkennen. Die Reaktion bzw. die Amplifikation läuft in drei Schritten ab. Der Zyklus umfasst:

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Probe
- Anlagerung der Primer („Annealing“)
- DNA-Strangverlängerung mittels der Polymerase („Extension“).

Bei einem Zeitaufwand von wenigen Minuten für einen Zyklus gelingt so die Vervielfältigung einer zu untersuchenden Sequenz in kurzer Zeit exponentiell um einen Faktor von 10^5 - 10^6 . Je nach Fragestellung ist zwischen qualitativen und quantitativen Versuchsauswertungen zu unterscheiden. In vielen Anwendungsbereichen, z.B. Nachweis genetischer Prädispositionen für hereditäre Erkrankungen, allgemeine Genmutationen oder die gezielte Suche nach viralen und mikrobiologischen Erregern, war für eine entscheidende Entwicklung gesorgt worden. Ein Beispiel für die PCR als sensitives Nachweisverfahren für Fremd-DNA ist, neben der schon erwähnten Differenzierung der HPV-Typen, die inzwischen routinemäßig durchgeführte Identifikation von Zytomegalie- oder Hepatitis-B-DNA. Die gewonnenen Kenntnisse über das Genom der humanen Papillomviren ermöglichen einen effizienteren und spezielleren Versuchansatz und Virussuche. Parallel dazu wurden die Versuchs- und Auswertemethoden zunehmend sensibler. Neben der reinen Detektion von HPV-DNA, besteht heute die Möglichkeit (bei dem Wissen, dass verschiedene Typen auch kombiniert in einer Läsion auftreten können), gleichzeitig eine möglichst genau differenzierende Analyse und Klassifikation der nachgewiesenen Virus-DNA zu leisten (Orth et al., 1978). Der entscheidende Faktor dabei ist die Variationsbreite der Primer. Passend zur jeweiligen Versuchszintention entscheidet ihr Design über Spezifität und Sensitivität der Ergebnisse. Im direkten Vergleich ist der PCR ein

größerer Spielraum als der In-situ-Hybridisierung gegeben. Zur Fragestellung passend sind die Primerkombinationen wählbar. Außerdem liegt die Virus-DNA-Nachweisschwelle bei der PCR, gemessen in Kopienzahl pro Zelle, deutlich niedriger, was ein nicht zu unterschätzendes Risiko für mögliche Kontaminationen bedeutet.

1.3 Zielsetzung

Vergleicht man die verschiedenen Veröffentlichungen zum HPV-Vorkommen in malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, ergibt sich eine Prävalenzspanne von 0 bis 100 % (Woods et al., 1993). Außerdem fällt eine relativ geringe Nachweisrate in Gewebeproben mit histologisch hochgradigem HPV-Infektionsverdacht, auf, bezogen vor allem auf den Befund einer Koilozytose.

Mit dem Einsatz der Southern-Blot-Hybridisierung in den meisten Studien wurde bisher der Schwerpunkt auf eine typenspezifische HPV-Suche gesetzt. Ähnlich wie bei der typenspezifischen PCR, gelingt abhängig von den ausgewählten DNA-Sonden der Nachweis von bestimmten bekannten Virustypen, im Gegensatz zu einer PCR mit „general“-Primern und damit allgemeinerem Ansatz. Die Bedeutung der Wahl der Methode und ihrem Detektionsspektrum erklärt die zum Teil große Variation der veröffentlichten Studienergebnisse. Zu berücksichtigen sind die unterschiedliche, ansatzabhängige Spezifität und Sensitivität um die Aussagekraft einer Untersuchung richtig einzuordnen (Gregoire et al., 1989; Elamin et al., 1998; Nees et al., 1998).

In den letzten Jahren ging die Tendenz zu einem erweiterten HPV- Nachweis-Spektrum. Abgeleitet werden die Primer von sehr konservierten Genomregionen, meistens aus dem offenen Leseraster L1, welche zwischen den einzelnen Virustypen nur geringgradige Sequenzunterschiede zeigen.

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit ist der Einsatz sogenannter „degenerate consensus“-Primer. Unter Berücksichtigung der großen HPV-DNA-Sequenzheterogenität sind die Primer in ihrer Form mit bewusst reduzierter Spezifität (durch Nukleotidvarianz in den konservierten Genomabschnitten) so konzipiert, dass ein Potential zur Detektion noch unbekannter HPV-Typen be-

steht. Ausgangspunkt waren die von Berkhout und Mitarbeitern entwickelten „degenerate consensus“-Primer (Berkhout et al., 1995). Entwickelt wurden diese Primer in Anlehnung an die sogenannten E.V.-Typen-Sequenzen. So bestand unter Umständen die Möglichkeit Amplifikate von noch unbekannten HPV-Genomsequenzen nachzuweisen (Shamanin et al., 1994). Um die Sensitivität wieder zu erhöhen, wurde mit dem PCR-Produkt im Anschluss eine zweite PCR durchgeführt, eine sogenannte „nested PCR“.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Tumore

In den Jahren 1995 bis 2002 wurden bei 44 Patienten der Essener Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik mit der Diagnose Plattenepithelkarzinom des Oropharynx im Rahmen der diagnostischen Panendoskopie, der Primäroperation oder Kontrollendoskopie sowohl aus dem Tumorgebiet als auch aus Bereichen unauffälliger Schleimhaut Proben gewonnen. Die 44 Patienten (35 männliche und 9 weibliche) hatten ein Durchschnittsalter von 55,1 Jahren (34 bis 81 Jahre). Bei 14 Patienten wurden mehrfache Probenentnahmen durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial umfasste insgesamt 61 Gewebebiopsien.

13 Proben stammten aus normaler Schleimhaut (makroskopisch kein Anhalt für Tumorwachstum) der Tumorpatienten, meist Gewebe von der Gegenseite, oder zumindest in einem Sicherheitsabstand gewonnen.

Die folgenden zwei Tabellen beziehen sich auf die insgesamt 48 Gewebebiopsien aus Tumorgewebe.

Tab. 1: Tumorstaging

	T1	T2	T3	T4
N0	3	5	0	2
N1	1	1	2	1
N2a	0	0	0	0
N2b	2	2	4	6
N2c	0	3	2	11
N3	0	0	0	3
Gesamt	6	11	8	23

Tab. 2: Tumorgrading

	G1	G2	G3
Anzahl	3	38	7

Zum Zeitpunkt der Operation waren 30 Patienten noch ohne Vorbehandlung mit einer Radio- oder kombinierten Radiochemotherapie. Bei 12 Patienten war die

Tumorregion mit 50-70 Gy vorbestrahlt, und fünf Patienten hatten eine kombinierte Radiochemotherapie abgeschlossen. Von den insgesamt 19 Biopsien der 17 vorbehandelten Patienten, erbrachten 13 Proben in der Histologie ein Tumorresiduum.

Die zwei- bis vierfache Probenentnahme bei 14 Patienten erfolgte dreizehnmal zum gleichen Zeitpunkt und einmal im Zeitintervall. In drei Fällen wurde aus verschiedenen synchronen Tumorlokalisationen biopsiert und dreizehnmal zur Kontrolle aus makroskopischem Normalgewebe.

Die Biopsien wurden bis zur weiteren Untersuchung nativ bei -80 °C gelagert.

2.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden die aufgetauten und in 1-2 mm große Stücke geschnittenen Gewebeproben zunächst zur Fixierung in 1 mL reinen Ethanol für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Drehmischer (100 U/min) inkubiert.

Nach dem Zentrifugieren (5 min bei 12000 U/min bei Raumtemperatur, Eppendorf-Zentrifuge 5415C), Abpipettieren des Ethanols und Trocknen der Proben erfolgte die Proteinase-K-Lyse. Dazu wurden die Proben in 250 µL 2x PK-Puffer und 250 µL Aqua bidest gelöst mit Zusatz von 10 µL Proteinase K (20 mg/mL). Zur Lyse verblieben die Proben über Nacht im Drehmischer (100 U/min) bei 37 °C.

Nach Zusetzen von zunächst 500 µL Phenol pro Probe (Carl Roth GmbH & Co), anschließendem Mischen (10 Minuten im Drehmischer bei Raumtemperatur [RT]), Abzentrifugieren (5-10 Minuten bei 10000 U/min und RT) und sorgfältigem Abpipettieren des Überstandes wurde dieser Durchgang (Mischen und Abpipettieren) noch zweimal wiederholt, wobei statt des reinen Phenols erst eine Mischung aus 250 µL Phenol und 250 µL CIA (Chloroform und Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 25:1) eingesetzt wurde, gefolgt von 500 µL CIA.

Der nach diesen drei Durchgängen gewonnene Überstand wurde zum Präzipitieren mit Natriumacetat (3 M, pH 5,5, 50 µL) im Verhältnis 9:1 versetzt und die DNA mit Hilfe reinen Ethanols (das doppelte Volumen des Probenansatzes) ausgefällt. Die Proben wurden 2 Stunden bei -20 °C inkubiert.

Abschließend erfolgten zur Gewinnung des Präzipitates ein erneutes Zentrifugieren (Zentrifuge Sigma 2K15, Braun Biotechnik International, für 30 Minuten bei 12000 U/min und $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), vorsichtiges Abgießen des Überstandes, Waschen mit 70%igem Ethanol, erneutes Zentrifugieren (5-10 Minuten bei 12000 U/min und $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), Abgießen und Trocknen der DNA.

Zur Rekonstitution des Präzipitates wurde TE-Puffer (ca. 500 μL , je nach geschätzter DNA-Menge, variabel zwischen 50-500 μL) eingesetzt.

Die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte im Anschluss durch Auftragen von 10 μL Probe mit 3 μL Bromphenolblau (BPB) und 10 μL Marker II (Molecular Weight Marker, Boehringer Mannheim, umfasst einen Bereich von ungefähr 2300 bp Fragmentgröße, 10 μL der Stammlösung) auf einem 1%-igen Agarosegel zur Elektrophorese (Laufzeit von zwei bis drei Stunden bei 45 Volt, Bio-Rad Power Pac 3000).

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

2.3.1 PCR-Primer und Kontrollen

Durchgeführt wurde die PCR (Saiki et al., 1988) in zwei Schritten mit zwei verschiedenen Primer-Sets, jeweils bestehend aus einem degenerierten Primer-Paar (Berkhout et al., 1995), abgeleitet aus dem Open Reading Frame (ORF/L1) des HPV-Genoms. Die Primer werden modifiziert durch eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bam*H I (an den Enden), um die Möglichkeit einer eventuellen Klonierung später zu wahren.

Für den ersten Schritt wurden der 5'-Primer mit der Nukleotidsequenz 5' TTG GAT CCC A(A/G)G GTC A(C/T)A A(C/T)A ATG G(C/T)A T 3' (CP65F) und der 3'-Primer mit der Sequenz 5' TTG GAT CCA A(C/T)T TTC GTC C(C/T)A (A/G)AG (A/G)A(A/T) ATT G(A/G)T C 3' (CP70F) verwendet (GIBCO BRL[®] Custom Primers). Abhängig vom möglichen HPV-Typ in der Proben-DNA amplifiziert dieses Primer-Paar ein Produkt von 452 bis 467 bp Länge.

Im zweiten Schritt, der sogenannten nested PCR (Berkhout, 1995) wurden die Primer CP66F und CP69F eingesetzt, deren Anlagerungssequenz innerhalb der

von CP65F und CP70F umrahmten Region liegt. Die Nukleotidsequenz des 5'-Primers war hier wie folgt: 5' TTG GAT CCA ATC A(A/G)(A/C) TGT TT(A/G) TTA C(A/T)G T 3' (CP66F), diejenige des 3'-Primers 5' TTG GAT CCG (A/T)TA GAT C(A/T)A CAT (C/T)CC A(A/G)A A 3' (CP69F). Es entsteht ein 374 bis 389 bp langes Produkt.

Eingeschlossen in jeden Arbeitsschritt beider PCR-Protokolle waren Negativkontrollen, bestehend aus Wasser, und als HPV-freie DNA-Probe wurde Plazenta-DNA eingesetzt.

Als Positivkontrolle wurde HPV 57-DNA (in absteigender Konzentrationsreihe von 1-1000 Genomkopien pro Zelle) verwendet. Diese wurde uns dankenswerterweise vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung für Tumovirus-Charakterisierung, Prof. Dr. E. M. de Villiers zu Verfügung gestellt.

2.3.2 PCR-Amplifikation

Der PCR-Ansatz bestand pro Probe aus 3 μL MgCl_2 (0,025 M), 1 μL Nukleotidtriphosphate (je 0,01 M von jedem NTP), 5 μL Taq-Puffer (0,02 M Tris-HCl, 0,016 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,001 M MgCl_2 ; pH 8,55), 7,62 bzw. 9,31 μL Primer CP65F und CP70F (6,56 pmol/ μL bzw. 5,42 pmol/ μL), 8,67 μL H_2O und 0,5 μL Taq-Polymerase (AGS Taq-Polymerase[®], 1 U). 35 μL dieses Ansatzes wurden mit 12 μL H_2O und 3 μL Probe (50 ng/ μL) gemischt. Die Inkubation erfolgte in einem Thermal Cycler (Peltier Model PTC-200, MS Research/The DNA Engine[®]). Für die Reaktion mit dem CP65F/CP70F Paar begann die PCR mit einer Aufwärmphase bei 94 °C für 6 Minuten. In Tabelle 3 ist das Zeitschema für die verschiedenen Temperaturen der folgenden drei Reaktionsschritte (Denaturierung der DNA, Anlagern der Primer [sog. „annealing“] und Extension der DNA-Stränge) aufgeführt.

Tab. 3: PCR-Schema I

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Start	94 °C	6 min	1
Denaturierung	94 °C	40 s	40
Anlagern	50 °C	2 min	40
Verlängerung	72 °C	40 s	40

Für die darauf folgende nested PCR wurden 3 µL Probe jeweils von den angesetzten und amplifizierten Proben aus dem ersten Schritt verwendet in einem Ansatz von 4 µL MgCl₂ (0,025 M), 1 µL NTPs, 5 µL Taq-Puffer (10X), jeweils 5 µL der Primer CP66F/CP69F, 14,5 µL H₂O und 0,5 µL Taq-Polymerase (Ampli Taq Gold®, Perkin Elmer).

Ein spezifisch auf die Polymerase abgeändertes Temperaturprogramm begann nach einem Start bei 94 °C (9 min), gefolgt von einem Zyklus von 94 °C (1 min), 50 °C (2 min) und 72 °C (1 min); diese Temperaturenfolge wiederholte sich in insgesamt 39 Zyklen. Danach beschloss ein Extensionszyklus bei 72 °C (5 min) den Prozess.

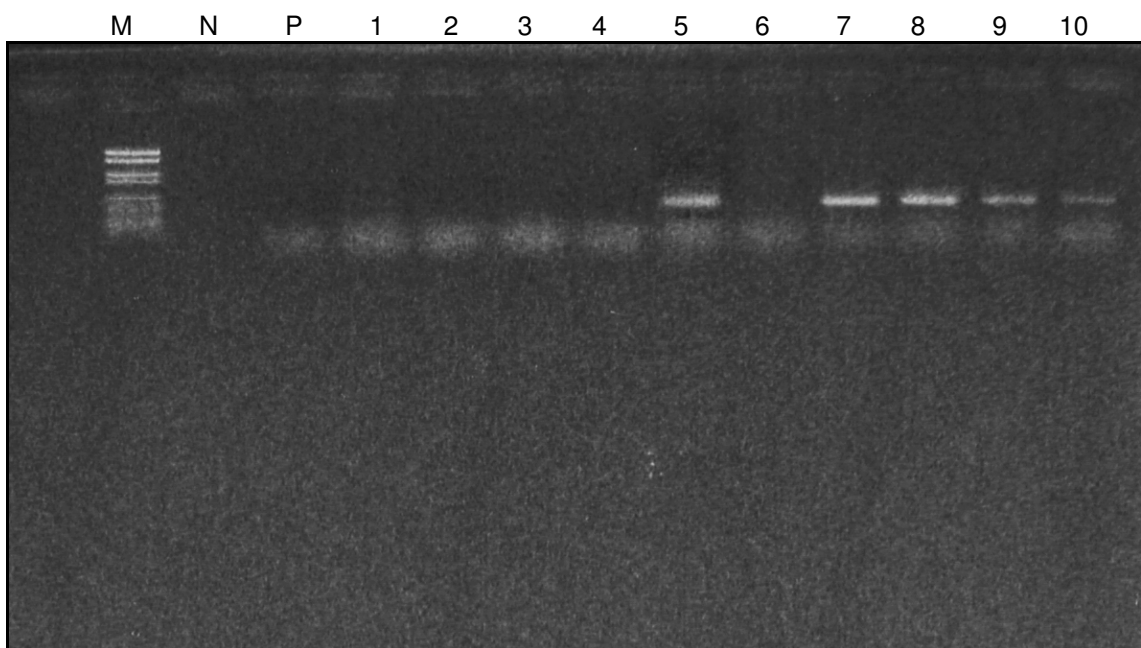
Tab. 4: PCR-Schema II

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Start	94 °C	9 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	39
Anlagern	50 °C	2 min	39
Verlängerung	72 °C	1 min	39

2.3.3 Gelelektrophorese

Nach erfolgter Amplifikation wurden von den Proben, nach Mischen mit 3 µL des Farbstoffes BPB, 10 µL auf einem 2%-Agarosegel aufgetragen und zwei Stunden unter 30 Volt Spannung aufgetrennt (BioRad Power Pac 3000).

Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (50 µL 10%iges Ethidiumbromid auf 1 L Elektrophorese-Puffer für 20 Minuten). Die Proben, die nach dieser Färbung im UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) ein Signal bei 517 bp zeigten, wurden weiter sequenziert.



- M: Marker VI
- N: Aqua bidest
- P: Plazenta-DNA
- 1-6: Tumor-DNA
- 7: 1000 Genomkopien HPV 57-DNA pro Zelle
- 8: 100 Genomkopien HPV 57-DNA pro Zelle
- 9: 10 Genomkopien HPV 57-DNA pro Zelle
- 10: 1 Genomkopie HPV 57-DNA pro Zelle

Abb. 1: Gelelektrophorese nach PCR

2.4 Sequenzierung

Durchgeführt wurde die Sequenzierung basierend auf dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger unter dem Zusatz von Dideoxynukleotiden (Schacher et al., 1968; Sanger et al., 1977; Meckelein, 1991) modifiziert als Chemilumineszenz-Sequenzierung (Slatko, 1990; Guiliano et al., 1999). Verwendung findet hierbei die Vent[®] (exo⁻) DNA Polymerase (Fuchs und Pfister, 1984).

2.4.1 Probenansatz

Hierzu wurde jede Probe jeweils auf vier Reaktionsgefäße verteilt. Im Ansatz befanden sich (neben 1 µL Proben-DNA, 1 µL 3%-Triton, 8,5 µL H₂O und 1,5 µL CircumVent Sequencing Puffer) biotinylierte Primer (2 µL; entweder CP65F/CP70F oder CP66F/CP69F, abhängig davon, aus welchem PCR-Durchgang die Probe gewonnen wurde) und die DNA-Polymerase (1 µL, 2 U Vent [exo⁻]- DNA-Polymerase).

In die Reaktionsgefäße vorab verteilt wurde ein Nucleotidtriphosphatgemisch (jeweils 3 µL), zusammengesetzt aus Deoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs). Jedes der vier Röhrchen enthielt alle vier verschiedenen dNTPs, aber nur jeweils ein ddNTP.

2.4.2 Sequenzierreaktion

Die Proben wurden mit 3,2 µL von dem beschriebenen Ansatz gemischt und mit folgendem Temperaturprogramm in den Thermocycler (Peltier Thermal Cycler – 200 MS Research Engine[®]) gegeben: 20 s bei 95 °C, 20 s bei 53 °C und 20 s bei 72 °C. Nach insgesamt 20 Zyklen wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 4 µL Stop-Lösung beendet.

2.4.3 Gelelektrophorese

Zur Sequenz-Analyse der Nukleinsäuren wurde ein Polyacrylamid-Gel verwendet. Der Ansatz beinhaltete 16 mL Konzentrat, Verdünner 74 mL (500 g Harnstoff pro Liter), 10 mL Puffer-Konzentrat (50% Harnstoff in 1 M Tris-Borat, 0,02 M EDTA-Puffer, pH 8,3). Abschließend wurden noch 0,8 mL einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung und 40 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) auf 100 mL Lösung zugegeben (alle aufgeführten Lösungen aus der Serie Rotiphorese[®], Carl Roth GmbH & Co). Aus zwei Glasplatten (40 x 33,5 cm und 42,5 x 33,5 cm; Life Technologies[®]) und zwei Platzhaltern (Vinylspacer; Life Technologies[®]) wurde eine Gießkammer vorbereitet. Die Glasplatten wurden vor jedem Versuch zunächst mit Seife gereinigt, mit deionisiertem Wasser abgespült und mit reinem Alkohol abgerieben. Abschließend erhielt die kleinere der beiden Glasplatten auf der Innenseite eine Schicht Silikon (Sigmacote[®] Roth), um nach Abschluss der Gelelektrophorese das Lösen der beiden Platten zu erleichtern und ein Haften des Gels an der größeren Platte zu sichern. Mit den beiden Spacern der Stärke 0,4 mm ist auch die Schichtdicke des Gels vorgegeben. Im Anschluss an das Gießen des Gels (mit einer Pipette zügiges blasenfreies Füllen vom Rand aus) wurden die Kämme (Vinyl-Haifischkämme, 0,4 mm Dicke, Life Technologies[®]) am Rand (der durch Überstand der größeren Platte gebildet wurde) eingelegt und damit die Kammern für die Proben gebildet. Nach Einspannen im Gelelektrophorese-Apparat (PS 9009 TC High Voltage Electrophoresis Power Supply–Model S2, Life Technologies[®]) und dessen Auffüllen mit 10x TBE- Puffer (siehe Anhang) wurde der Apparat auf die durch die Geldicke vorgegebenen Spannungswerte eingestellt (60 Watt, 1500-1900 Volt, 30-45 mA für 45 min). Vor dem Laden der Proben erfolgte ein Vorlauf, damit die Gelelektrophoreseapparatur eine Temperatur von 40-44 °C erreichte. Nach festem Schema wurden je 3 µL Probe von links nach rechts in die vorbereiteten Gel-Kammern eingefüllt, beginnend mit der Kontrollprobe (gebrauchsfertig in dem Sequenzier-Kit von New England Biolabs[®] enthalten) in der Reihenfolge:

G A T C. Die Laufzeit betrug im Durchschnitt zwei Stunden.

2.4.4 Transfer der DNA

Nach beendeter Elektrophorese und Trennen der beiden Glasplatten erfolgte der direkte Transfer der DNA auf eine neutrale bis schwach positiv geladene Nylon-Membran (Gene-Screen NEN[®] Life Science Products). Nach dem Sandwich-Prinzip wurde dazu die vorher in TE-Puffer getränkte Membran, falten- und blasenfrei, auf das Gel gelegt, eingebettet in mehrere Lagen Filterpapier (Whatman[®]-Filterpapier), wobei die unteren Lagen ebenfalls vorher in Puffer getränkt wurden. Obenauf wurden zwei bis drei trockene Lagen appliziert, womit die Richtung des Transfers durch Kapillarkraft des Puffers (von Gel zur Membran) bestimmt wird, auch Kapillarblotting genannt. Für 30 Minuten wurden die Proben zwischen die beiden Glasplatten gelegt und beschwert. Vorsichtiges Abziehen der Membran folgte, gegebenenfalls unter Abspülen mit TE-Puffer, um Haften von Gelresten an der Membran zu verhindern. Nach kurzem Abtrocknen an der Luft wurde die noch feuchte Membran bei 60 °C für 20 Minuten gebacken. Um die DNA an der Membran zu fixieren, erfolgte für 1 Minute ein UV-Crosslinking bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer Dosis von 1200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (UV-Stratalinker[®] 2400-Stratagene).

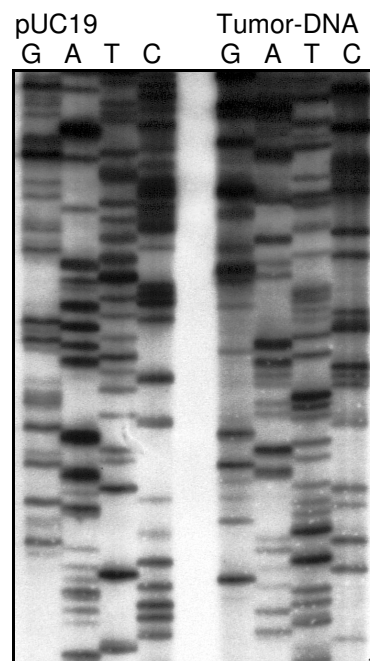
2.4.5 Chemilumineszenz-Reaktion

Nach vorgegebenem Protokoll (Phototope Detection Protocol, New England Biolabs[®]) mit Sequenzierreaktions-Kit (Phototope-Star[®] Detection Kit, NEB[®] 7020) erfolgte nun das Sichtbarmachen der Sequenzen durch Chemilumineszenz. Passend zur Größe des Gelausschnitts bzw. der Membran wurde aus Schlauchfolie (NeoLab, 25 cm x 0,2 mm x 10 m) ein Reaktionsbeutel vorbereitet und die Größe der Membran in cm^2 bestimmt.

Die sieben Reaktionsschritte in Folge:

1. *Blockierungsschritt*: 0,1 mL/cm² der „Blocking Solution“ wurde abgemessen, zu der Membran in den Reaktionsbeutel gegossen und unter gleichmäßigem Schwenken des Beutels für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert; Abgießen der Lösung vor dem nächsten Schritt schloss sich an.
2. *Streptavidin Inkubation*: 0,05 mL/cm² der verdünnten Streptavidin-Lösung (ursprüngliche Konzentration 1,0 mg/mL Streptavidin; vor dem Versuch wurde mit „Blocking-Solution“ 1:1000 verdünnt auf die endgültige Konzentration von 1 µg/mL Streptavidin) wurden ebenfalls für 5 Minuten bei RT kontinuierlich geschwenkt, dann abgegossen.
3. *Waschvorgang I*: Zweimal wurde mit je 0,5 mL/cm² „Wash Solution“ I (1:10 verdünnte „Blocking Solution“: 0,0017 M Na₂HPO₄, 0,0008 M NaH₂PO₄, 0,0125 M NaCl, 0,5% SDS) nach beschriebener Vorgehensweise gespült.
4. *Biotinylierte alkalische Phosphatase Inkubation*: 0,05 mL/cm² der verdünnten alkalischen Phosphatase-Lösung (ursprüngliche Konzentration: 0,5 mg/mL biotinylierte alkalische Phosphatase; vor dem Versuch mit „Blocking Solution“ 1:1000 verdünnt auf 0,5 µg/mL) wurden hinzu gegeben; weiteres Vorgehen wie beschrieben.
5. *Blockierungsschritt*: Versetzen mit 0,5 mL/cm² „Blocking Solution“ (siehe 1.) ebenfalls für 5 Minuten, wie beschrieben.
6. *Waschvorgang II*: Zweimal wurde mit je 0,5 mL/cm² 1X „Wash Solution“ II gespült (siehe Anhang).
7. *Detektion der DNA*: Zugabe von 0,025 mL/cm² CDP-Star Reagenz (0,025 M Lösung, vor Anwendung mit CDP-Puffer im Verhältnis 1:100 zu verdünnen; vorab wurde der 25x CDP-Puffer mit Aqua bidest verdünnt), die für 5 Minuten bei RT im Reaktionsbeutel gleichmäßig verteilt wurden. Im Anschluss wurde sorgfältig abgegossen und die Membran (im Reaktionsbeutel) faltenfrei in einer Filmkassette fixiert. Für eine Belichtungszeit von durchschnittlich 5 Minuten (variabel nach jeweiliger Reaktionsstärke, abzulesen am Schwärzungsgrad des Films) wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat XAR 5) eingelegt (die Entwicklung erfolgte automatisch in einem Entwickler (Curi 160, Agfa). Zur Auswertung wurden die Banden auf dem Film vom unterem zum oberen Ende der Membran gelesen und als Basensequenz notiert. Durchschnittlich ergaben sich Sequenzen von 150 bp Länge.

Mittels des BLAST-Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) der NCBI (National Center for Biotechnology Information; National Library of Medicine; National Institutes of Health, Bethesda, MD 20984, USA) (Altschul et al., 1997) wurde nach Übereinstimmungen der Gensequenzen im Vergleich zu gespeicherten Sequenzen der Datenbanken des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und der Database of Japan gesucht. Hierzu wurde das Programm DNASIS® für Windows (Hitachi Software Engineering Co., LTD. Genetic Systems, San Francisco, CA, USA) eingesetzt und der Lipman-Pearson FASTA Algorithmus angewandt (Lipman und Pearson, 1985)



Legende:

G: Guanin

A: Adenin

T: Thymin

C: Cytosin

pUC19: Kontroll-DNA

Abb. 2: Sequenzgel

3 Ergebnisse

Von den 61 untersuchten Gewebebiopsien zeigten 16 ein Signal in einem oder beiden PCR-Durchgängen (26,2%). 49 Biopsien stammten aus Karzinomgewebe und 12 waren Kontrollbiopsien aus makroskopischem Normalgewebe desselben Patienten. Die 16 positiven Proben wurden sequenziert. Von den auf diese Weise untersuchten Proben ließen sich 12 direkt sequenzieren und sieben Sequenzfolgen im Weiteren auf Homologien überprüfen.

Die 16 positiven Proben verteilten sich auf 12 Patienten (10 Männer, 2 Frauen). Mit Ausnahme der Beschreibung der Tumorlokalisation und der Primer bleibt die positive Normalgewebeprobe in den Darstellungen unberücksichtigt.

3.1 Tumorlokalisation

Tab. 5: Tumorlokalisationen

	Tonsille	Gaumen	Glossotonsillarfurche	Zungengrund
Gesamt	24 (39,3%)	8 (13,1%)	9 (14,7%)	20 (32,7%)
Davon positiv	9 (56,2%)	1 (6,2%)	3 (18,7%)	3 (18,7%)

Mit fast 40% der gesamten Probenanzahl und über 50% der positiven Gewebebiopsien war die Tonsillenregion die Hauptlokalisation. Der Zungengrund war die zweithäufigste Tumorlokalisation (über 30%). In Biopsien aus dem Zungengrund und der Glossotonsillarfurche gelang der positive DNA-Nachweis, mit jeweils 20%, gleich häufig.

3.2 Tumorstadium

Tab. 6: Aufteilung der 15 PCR-positiven Proben aus Tumorgewebe

	T1	T2	T3	T4
N1	1	0	2	1
N2b	2	0	0	4
N2c	0	0	0	4
N3	0	0	0	1

Für das Stadium N0 und N2a der TNM-Klassifikation gab es keinen positiven Nachweis. 66,6% (10 von 15) der positiven Gewebebiopsien stammten von einem T4-Tumor, ausgehend von 47,9% T4-Karzinomen in der Gesamtzahl (23 von 49 Proben).

3.3 Histologie

Tab. 7: Histologie

	G1	G2	G3
Gesamt	3 (6,1%)	39 (79,6%)	7 (14,3%)
Davon positiv	0	12 (75,0%)	3 (18,7%)

Die Gesamtzahl der Karzinombiopsien betrug 49, wobei die Kontrollbiopsien (12) von makroskopisch unauffälliger Schleimhaut abgezogen worden sind.

3.4 Zeitpunkt der Biopsie

Tab. 8: Abhängigkeit vom Therapiestadium

	Erstdiagnose	Zustand nach Radiatio	Zustand nach Radiochemotherapie
Gesamt	30	14	5
Davon positiv	10	3	2

Tab. 9: Abhängigkeit vom histologischen Befund

	Zustand nach Radiatio neg. Histo	Zustand nach Radiatio pos. Histo	Zustand nach Radiochemo neg. Histo	Zustand nach Radiochemo pos. Histo
Gesamt	5	9	1	4
Davon positiv	0	3	1	1

3.5 Primer

Aufgeteilt nach den jeweiligen Primern zeigten acht Proben sowohl bei CP65F/CP70F und CP66F/CP69F ein positives Signal, sechs Proben nur mit CP66/69, zwei waren nur im ersten PCR-Durchgang (Primer CP65F und CP70F) positiv.

Von den sieben erfolgreich sequenzierten DNA-Proben waren drei in beiden PCR-Durchgängen, eine nur in der ersten bzw. drei nur in der nested PCR positiv.

Die sieben Proben wiesen folgende Verteilung auf:

Normalgewebebiopsie:	1
T4N2b Tumore:	2
T4N2c Tumore:	3
T4N3 Tumor:	1

Davon lassen sich die sechs Tumorbiopsien weiter unterteilen in:

Biopsie aus vorbestrahlter Tumorregion:	1
Biopsie bei Zustand kombinierter Radiochemotherapie:	1
Biopsien bei Erstdiagnose, ohne Vorbehandlung:	4

Die positive Normalgewebeprobe und die positive Biopsie eines T4N2c Tumors mit erfolgter kombinierter Radiochemotherapie und negativer Histologie in der Kontrollbiopsie stammten vom selben Patienten.

3.6 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Nach zum Teil mehrfachen Sequenzierungs- und Auswertungsdurchgängen erfolgte der Abgleich mit den Datenbanken (EMBL, European Molecular Biology Laboratory und Database of Japan) mittels DNASIS® für Windows, Version 2.6 (Hitachi Software Engineering Co., LTD. Genetic Systems, San Francisco, CA, USA). Nach dem dabei höchsten ermittelten „Score“ wurde auf vermutliche HPV-Typen geschlossen. Die festgestellte Sequenzhomologie kam nicht über 70%. Fehlte eine signifikante Differenzierung, so wurden für die Biopsie auch mehrere mögliche HPV-Typen angegeben.

Folgende Übereinstimmungen ergaben sich im Homologievergleich:

Biopsien bei Erstdiagnose

HPV 13/ HPV 75/ HPV 47	(T4N3)
HPV 72/ HPV 37	(T4N2c)
HPV 63/ HPV 11	(T4N2b)
HPV 51/ HPV 82/ HPV 77/ HPV 58	(T4N2b)

Biopsie nach Bestrahlung

HPV 23/ HPV 2a	(T4N2c)
----------------	---------

Biopsie nach kombinierter Radiochemotherapie

HPV 50/ HPV 6/ HPV 49/ HPV 63 (T4N2c)

Normalgewebebiopsie

HPV 2a (T4N2c)

4 Diskussion

4.1 Methodenvergleich

Bei den aufgezeigten Ergebnisdifferenzen von 0 bis 100% beim Nachweis von humanen Papillomviren in malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches (Paz et al., 1997; Arndt et al., 1997; Watts et al., 1991) wird die Notwendigkeit eines Methodenvergleiches offensichtlich. Betrachtet man die verschiedenen Ergebnisse vor dem Hintergrund der methodischen Erneuerungen und Weiterentwicklungen, ist damit das zentrale Problem angesprochen, die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien betreffend. Zu berücksichtigen sind außerdem die unterschiedlichen Ansätze der Studien, was eine gezielte Typensuche oder den allgemeinen Virusnachweis angeht bzw. die ausgesuchte Gewebedignität und gegebenenfalls eingeschränkte Biopsielokalisation betrifft.

Die besondere Herausforderung liegt in der Berücksichtigung der großen Heterogenität der Virusgruppe. Bei derzeit über 80 bekannten und klassifizierten Typen scheint die obere Grenze noch nicht erreicht, und es ist von weiteren noch unbekannten HPV-Typen auszugehen (Snijders et al., 1990; Berkhout et al., 1995; Harwood et al., 1999). Dies erklärt auch, warum man nicht von „HPV-negativen“ Tumoren sprechen kann, da vielleicht unbekannte HPV-Sequenzen mit der Versuchsanordnung nicht detektiert werden und derzeit noch keine Breitspektrum-PCR den Anspruch auf hundertprozentige Sensitivität haben kann. Mit dieser Erkenntnis erscheinen Feststellungen über HPV-Vorkommen als Prognosefaktor der Tumorerkrankung und Überlebensaussicht noch fragwürdig und nicht fundiert.

Schon früh ist auch das synchrone Auftreten von verschiedenen HPV-Typen in derselben Läsion beschrieben worden (zur Hausen, 1977). Damit ergibt sich ein weiteres, nicht unwesentliches Problem für die spezifische und möglichst sensitive HPV-Suche. Während andererseits gerade diese Tatsache dem Untersucher die Möglichkeit des breiten Nachweisspektrums bietet.

Seit den Anfängen der Molekularbiologie galt als Goldstandard für die HPV-Detektion die Southern-Blot-Hybridisierung. Primär lag der Schwerpunkt auf einer gezielten Suche nach bekannten HPV-Gensequenzen. Die Sensitivität

liegt dabei zwischen 0,1 und 0,01 Kopien pro Zelle. Von einer Restriktionsendonuklease gesplante DNA wird nach gelelektrophoretischer Auftragung auf eine Membran transferiert und mit einer markierten HPV-Sonde hybridisiert. Diese Methode ermöglicht auch die Aussage, ob die Virus-DNA in der Wirts-DNA integriert oder episomal vorliegt.

Mit Hilfe der Southern-Blot-Hybridisierung gelang der eindeutige Nachweis von „high risk“ Typen in der Mund- und Kehlkopfschleimhaut (Stremlau et al., 1987; de Villiers, 1991). Gissmann setzte 1982 in seinem Versuchsaufbau die Spezifität erstmals herab (Gissmann et al., 1982). Mit dem Einsatz von einem „HPV-Cocktail“ als Sonde in der Hybridisierung wurde bewusst der mögliche Nachweisrahmen erweitert in der Hoffnung, mehr als einen HPV-Typen finden zu können. Nach Untersuchungen von de Villiers kann auch das Aufspüren noch unbekannter HPV-Typen gelingen, wenn diese nur in sehr hoher Kopien-Zahl vorliegen (de Villiers, 1992).

1994 verglich Fukushima Southern-Blot-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion (Fukushima et al., 1994). Von 103 PCR-Produkten zeigten neun (8,7%) ein positives Signal auf der Suche nach HPV 16 und 18. Von diesen stammen interessanterweise immerhin fünf Proben aus Tonsillengewebe. Bei der anschließend durchgeführten Kontrolle mit der Southern-Blot-Hybridisierung ließ sich nicht eine der positiven Reaktionen wiederholen. In verschiedenen Vergleichsuntersuchungen hat die PCR die Hybridisierung an Sensitivität überholt (Almadori et al., 1996; Gravitt und Manos, 1992). Bei McKaig lagen die Ergebnisse in einer Studie über HPV-Nachweis bei malignen Kopf-Hals-Tumoren mittels PCR bei 34,5% versus 24,5% nach Southern-Blot-Hybridisierung (McKaig et al., 1998).

Dazu kommen die praktischen Vorzüge der PCR mit einem einfacheren, schnelleren und effektiveren Vorgehen. Eine untere Nachweisgrenze von einer Kopie HPV-DNA pro 100000 Zellen war mit den herkömmlichen Verfahren nicht zu erreichen. Diese Sensitivität birgt in sich jedoch die Gefahr von falsch positiven Resultaten bei hohem Kontaminationsrisiko.

Im Vergleich zu Untersuchungen beim Zervixkarzinom kommt hinzu, dass allgemein die HPV-Konzentration pro Zelle im Kopf-Hals-Bereich niedriger liegt. Auch erfolgt eine Integration von Virus-DNA in das Genom der Wirtszelle viel seltener als in Geweben des Anogenitaltraktes (zur Hausen, 1998).

Im Verlauf der letzten Jahre hat sich in den Versuchsansätzen zum HPV-Nachweis eine Kombination aus mehreren PCR-Durchgängen etabliert. Vor allem das primäre Einsetzen von einer sogenannten „consensus PCR“ mit „general“ Primern, mit weit gefasstem Detektionsspektrum, gefolgt von einer typenspezifischen PCR zur genaueren Analyse des Amplifikats, hat sich mit stabilen Nachweisquoten und keiner geringen Sensitivität bewährt (Snijders et al., 1990).

Wie schon de Villiers, empfahl auch Gravitt in seiner Studie das Ableiten der „general“ Primer von den HPV-Gensequenzen L1 und E1, da sie am konserviertesten und stabilsten sind und bei einer geringen Anzahl der Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen HPV-Typen auch den ORF's E6 und E7 überlegen ist. Das Design der Primer gibt dabei die Zielrichtung des Versuches und das Spektrum der möglichen amplifizierbaren Typen vor (Gravitt und Manos, 1992).

Im Ansatz dieser Arbeit wird Bezug genommen auf Arbeiten von Manos et al. (1989) wie auch Harwood et al. (1999) mit sogenannten degenerierten Primern. Speziell für die Fragestellung nach neuen noch unbekannten HPV-Typen erfolgt so eine Verminderung der Spezifität durch bewusst gewählte Veränderung der Basenfolge im Primermolekül, und daraus folgend die Amplifikation verwandter, aber bisher noch unbekannter HPV-Sequenzen. Diese Erhöhung der Sequenzvariabilität ist aber auch nicht unbegrenzt möglich; unbestritten ist das erweiterte Nachweisspektrum.

In Untersuchungen an Hautwarzen von immunsupprimierten Patienten gelang Shamanin wie auch Harwood, mit Hilfe von degenerierten Primern und in Kombination mit einer nested PCR, ein hundertprozentiger Nachweis von HPV-DNA (Shamanin et al., 1994; Harwood et al., 1999). Mit dem Einsatz der sogenannten „Berkhout Primer“ in dieser Arbeit wurde bewusst die mögliche Nachweisgrenze weiter gefasst (Berkhout et al., 1995). Abgeleitet von den E.V.-HPV-Typen, dementsprechend kutanen Virustypen, sind die Sequenzhomologien erwartungsgemäß gering zu bereits in diesem Bereich vorbeschriebenen Typen. Dieser niedrige Übereinstimmungsgrad sollte ausreichend „Spielraum“ für die Detektion neuer, wenig verwandter Virus-DNA lassen.

4.2 HPV in Oropharynxkarzinomen

Die Häufigkeiten des HPV-Nachweises verteilen sich unterschiedlich auf die verschiedenen anatomischen Bezirke im Kopf-Hals-Bereich. Als ein Hauptprädi-
lektionsort lässt sich die Region des Oropharynx beobachten. Mit 60 bis 70% HPV-positiver Ergebnisse konnten Paz, Steinberg und Snijders einen bis zu dreifach erhöhten Nachweis, im Vergleich zu anderen Regionen des Oropharynx, in malignen Tumoren der Tonsillenregion ausmachen (Steinberg und Auburn, 1993; Paz et al., 1997). In der Literatur wird von durchschnittlich 43% HPV-positiven Pharynxkarzinomen berichtet (Watts et al., 1991; Brandwein et al., 1994; Snijders et al., 1996), ohne jedoch in Naso-, Oro- und Hypopharynx zu unterteilen. Als Erklärung für diese besondere Prävalenz dienen zahlreiche Vermutungen über die besondere Exposition dieser Region für äußere Reizstoffe und Erreger, dazu der Aufbau mit Epithelkrypten und höherer Metaplasieneigung. Eben diese nachgewiesene Metaplasie der oberen Epithelschichten soll eine Voraussetzung für eine HPV-Infektion sein. Außerdem könnte der Anteil von lymphatischem Gewebe mit dadurch erhöhter Reaktionsaktivität auf eine Virusinfektion von Bedeutung sein. Aufbauend auf der Theorie vom primären Infekt der basalen Zellschichten des Epithels zog Snijders die Möglichkeit einer Bahnung durch häufig rezidivierende bakterielle Infekte dieser Region in Betracht (Snijders et al., 1996).

Diese Arbeit beschränkte sich auf Plattenepithelkarzinome des Oropharynx. Entsprechend den oben zitierten Literaturangaben lag auch im Essener Patientenkollektiv mit 56% die Hauptlokalisation der positiven Biopsien im Bereich der Tonsillen. Mit dem HPV-Nachweis bei 26,2% liegt diese Studie in dem oben erwähnten allgemeinen Ergebnisrahmen bei Kopf-Hals-Tumoren. Auch wenn man sich auf die von Snijders und Brandwein beschriebenen 43% positiven Pharynxkarzinome bezieht, liegt dieses Ergebnis gut im allgemeinen Rahmen (Brandwein et al., 1994; Snijders et al., 1996). Bei einer möglichen systematischen Kontamination wären weit höhere Ergebnisse zu erwarten gewesen, und deutlich niedrigere, wenn die angewendeten Versuchsvorgänge nicht geeignet gewesen wären.

Nicht eindeutig bestätigt findet sich in diesem Ergebnisrahmen die These von Wilczynski et al. (1998) von steigender HPV-Inzidenz bei abnehmendem Differenzierungsgrad. In den untersuchten Gewebeproben waren die meisten HPV-positiv in histologisch mäßig differenzierten (G2) Zellverbänden (75%).

Bei 19 Patienten erfolgte die Biopsie nach primärer Radiatio und kombinierter Radiochemotherapie, von diesen zeigten 26% einen positiven HPV-Nachweis. 80% aus diesem Kollektiv boten histologisch ein Tumoresiduum.

4.3 Kritik

4.3.1 Probengewinnung

Die Probengewinnung für diese Studie erfolgte ausschließlich mittels Gewebebiopsie und somit, anders als bei einem Abstrich, auf ein lokal sehr eingeschränktes Untersuchungsfeld. Glaubt man einer Arbeit von Ostwald, so ist die gewählte Biopsielokalisation in einem Tumorgewebe nicht unerheblich für den zu erwarteten HPV-Nachweis. Demnach ist die Häufigkeit HPV-positiven Gewebes am Tumorrand höher als zentral (Ostwald et al., 1994). Ohne vorgegebene Maßgaben an die verschiedenen Operateure kann diese Studie darauf nicht näher eingehen. Zu erwähnen bleibt das ebenfalls dem Operateur überlassene Einschätzen von makroskopischer Normalschleimhaut als Kontrollgruppe. Alternativ zu überlegen, aber nicht realistisch umsetzbar, wäre die Probengewinnung in eine Hand zu legen, um sie systematischer zu gestalten.

4.3.2 Probenanzahl und Zusammensetzung

Mit einer Anzahl von 61 untersuchten Gewebebiopsien liegt die Fallzahl im Rahmen der üblichen Studiengrößen. Ginge es um eine konkrete Fragestellung wie einen bestimmten HPV-Typ oder Gewebelokalisation, wäre ein Vergleich mit anderen Studien erschwert, da die Patienten- und Probengruppen sehr heterogen zusammengesetzt sind. Einzuteilen sind die Untergruppen nach den

verschiedenen Gesichtspunkten wie Tumorgewebe bei Erstdiagnose und nach Therapie. Diese wiederum ist zu unterteilen in ausschließliche Operation, Radiation oder kombinierte Radiochemotherapie sowie weiter in Tumorrezidiv oder negative Histologie. Zugrundeliegende Idee ist die Überprüfung ob nach eintreten des Zelltods die Amplifikation von HPV-DNA gelingt. Für die Zielsetzung dieser Arbeit wiederum, die Methoden als Screeningsystem zu testen, bietet dieses Probenkollektiv einen repräsentativen Querschnitt. Blickt man auf die Ergebnisse von 16 positiven Proben, wovon eine aus klinisch gesundem Gewebe stammte, scheint die Probenzahl von Normalgewebe (12) für eine aussagekräftige Kontrollgruppe zu klein. Brandsma gibt z.B. einen zu 4% positiven HPV-Nachweis im gesunden Gewebe an. Insgesamt gehen aber auch hier die Meinungen auseinander, wenn man die Möglichkeit der latenten Infektion mit berücksichtigt (Brandsma und Abramson, 1989). Bei makro- wie mikroskopischem Normalgewebe besteht die Möglichkeit eine Viruspersistenz nachzuweisen (Viac et al., 1978).

Auf den möglichen Einfluss einer Tumor-HPV-Positivität auf das Überleben der Patienten braucht hier nicht weiter eingegangen zu werden. Diese Prognosefrage wird in der Literatur absolut kontrovers diskutiert. Von erhöhter Überlebenswahrscheinlichkeit (Chiba et al., 1996; Gillison et al., 1999) über keinen messbaren Unterschied (Pintos et al., 1999) bis hin zur verschlechterten Prognose (Brandwein et al., 1994) insbesondere nach erfolgter Bestrahlungstherapie (Schwartz et al., 2001) ist alles beschrieben. Unabhängig von einer größeren Fallzahlstudie, mit längerem Beobachtungszeitraum, ist eine fundierte Aussage schon allein aus oben erwähnter Problematik des nicht sicheren HPV-Ausschlusses bei einem Tumor mehr als fragwürdig.

4.3.3 HPV-Typisierung

Der letzte Untersuchungsschritt dieser Studie diente dem Homologievergleich der gewonnenen DNA-Sequenzen mit bekannten HPV-Typen, um nachzuweisen, dass tatsächlich HPV-DNA amplifiziert worden ist. Der Vergleich ergab, dass es sich bei den amplifizierten DNA-Sequenzen um HPV-DNA handelte. Die Sensitivität der ausgewählten Methode war mit einer Genomkopie pro Zelle

gut. Für eine Typenneuklassifizierung war das untersuchte Genomfragment zu klein, würde es doch einer kompletten Auswertung von L1, E6 und E7 bedürfen. Dies gehörte auch nicht zum Ziel dieser Arbeit. Im Weiteren ist das manuelle Sequenzierverfahren mit seinen Fehlerquellen zu berücksichtigen. Die angegebenen Homologieübereinstimmungen sind daher nicht als definitive Aussagen sondern als potentielle HPV-Typen zu werten.

4.4 Ausblick

Anders als beim Zervixkarzinom ist die Karzinogenität von HPV bei Kopf-Hals-Tumoren bisher nicht bewiesen.

Mit dem heutigen Wissensstand ist jedoch von einer pathogenen Rolle von HPV im Kopf-Hals-Bereich auszugehen. Es existieren verschiedene Theorien über das Zusammenspiel von HPV und, in diesem Bereich vor allem interessanten, karzinogenen Substanzen wie Nikotin und Alkohol – sei es, dass eine HPV-Infektion durch Schleimhautschädigung unterschiedlichster Art erst ermöglicht wird oder durch eine bereits persistierende (latente) Infektion so aktiviert wird.

Unbestritten ist die nachgewiesene Inzidenz und das Auftreten spezieller Virus-typen im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen.

Als Ausblick für die zukünftigen Entwicklungstendenzen dürfte die genauere Untersuchung der immunologischen Vorgänge bei HPV- Infektionen eine Rolle spielen. Nach Entwicklung von geeigneten, umfassenden Detektionssystemen könnte dem HPV-Status eine größere klinisch-praktische Bedeutung zukommen, wenn man die Idee des Screenings weiterverfolgt. Parallel dazu verläuft das Austesten geeigneter immunologischer Therapieansätze. Zu erwähnen wäre die bereits begonnene therapeutische Immunisierung bei Patienten mit aus-therapiertem Zervixkarzinom. Außerdem befinden sich verschiedene Immun-modulatoren in der Entwicklung (Leinmüller, 2001).

Nicht unerwähnt bleiben sollten an dieser Stelle Untersuchungen zum nachgewiesenen Zusammenspiel von HPV und Tumorsuppressormolekülen wie p53 und pRB. Damit ergeben sich Ausblicke auf weitere Ergebnisse und Aussagen zu molekularem Staging sowie veränderten therapeutischen Strategien.

5 Zusammenfassung

Der für eine Humane Papillomviren (HPV)-Infektion typische histologische Befund einer Koilozytose und Parakeratose ist auch oft in Gewebe zu erkennen, ohne dass der Virusnachweis gelingt.

Abhängig von der jeweiligen Zielsetzung ergibt sich die Bedeutung für die Wahl der Untersuchungsmethode. Vergleicht man die in der Literatur beschriebenen Studien über HPV-positive Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, so variieren die Ergebnisse zwischen 0 und 100%.

In dieser Arbeit sollte mit einem möglichst weiten Nachweisspektrum mögliche HPV-DNA in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx erfasst werden. Dazu gehörte der bewusste Verzicht auf Spezifität durch Einsatz von sogenannten degenerierten consensus Primern. Durch kleine Veränderungen der Nukleotidfolge der Primermoleküle in einer als konserviert bekannten Genomsequenz (sogenannte L1 Region) der Virus-DNA, wird den natürlichen Sequenzabweichungen unter den verschiedenen HPV-Typen imitiert. Um die Sensitivität wieder etwas zu erhöhen, erfolgte ein zweiter PCR Durchgang, eine sogenannte „nested PCR“.

Der Ansatz ging auf eine Breitspektrum-PCR zum Nachweis von humanen Papillomviren in kutanen Veränderungen der Epidermodysplasia verruciformis (E.V.) zurück. Abgeändert wurde der Ansatz durch Modifikation der degenerierten consensus Primer. Trotzdem war es mit diesem speziellen Ansatz möglich, HPV-DNA in Läsionen des Oropharynx nachzuweisen.

Mit dem positiven PCR-Ergebnis und dem erfolgreichen Sequenzieren in sieben Fällen, hat sich diese Art der Breitspektrum-PCR als taugliches Verfahren erwiesen, um HPV-DNA zu detektieren.

In Abhängigkeit der weiteren Entwicklungen, speziell der Idee von HPV-Immunisierung und Screeningverfahren, kommt diesen breitgefächerten Nachweisverfahren ein großer Stellenwert zu.

6 Literaturverzeichnis

1. Alani R.M., Münger K. (1998): Human papillomaviruses and associated malignancies. *J. Clin. Oncol.*, 16, No.1, 330-337.
2. Almadori G., Cadoni G., Cattani P., Posteraro P., Scarano E., Ottaviani F., Paludetti G., Maurizi M. (1996): Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur. J. Cancer* 32A, No.5, 783-788.
3. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997): Gapped blast and PSI-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-4002.
4. Arndt O., Johannes A., Zeise K., Brock J. (1997): HPV-Typen vom „high risk type“, in oralen und laryngealen Papillomen und Leukoplakien. *Laryngo-Rhino-Otol.* 76, 142-149.
5. Berkhout R.J.M., Tieben L.M., Smits H.L., Bouwes Bavinck J.N., Vermeer B.J., ter Schegget J. (1995): Nested PCR approach to detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal trans-plant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 690-695.
6. Beutner K.R., Tyring S. (1997): Human papillomavirus and human disease. *Am. J. Med.* 102 (5A), 9-15.
7. Bradford C.R., Zacks S.E., Androphy E.J., Gregoire L., Lancaster W.D., Carey T.E. (1991): Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 104, 303-310.

8. Brandsma J.L., Abramson A.L. (1998): Association of papilloma virus with cancer of head and neck. *Arch. Otolaryngol.* 115, 621-625.
9. Brandwein M., Zeitlin J., Nuovo G.J., MacConnell P., Bodian C., Urken M., Biller H. (1994): HPV detection using „hot start“ polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. *Mod. Pathol.* 7, 720-727.
10. Cerovac Z., Sarcevic B., Kralj Z., Ban J. (1996): Detection of human papillomavirus (HPV) type 6, 16 and 18 in head and neck squamous cell carcinomas by in situ hybridization. *Neoplasma* 43, 185-193.
11. Chan S.Y., Delius H., Halpern A.L., Bernard H.U. (1995): Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny and taxonomy. *J. Virol.* 69, 3074-3083.
12. Chiba I., Shindoh M., Yasuda M., Yamazaki Y., Amemiya A., Sato Y., Fujinaga K., Notani K., Fukuda H. (1996): Mutations in the p53 gene and human papillomavirus infection as significant prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oncogene* 12, 1663-1668.
13. Ciuffo G. (1907): Innesto positivo con filtrado di verrucae volgare. *G. Ital. MalVenereol.* 48, 12-17.
14. Clayman G.L., Stewart M.G., Weber R.S., El-Naggar A.K., Grimm E.A. (1994): Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 120, 743-748.
15. de Villiers E.-M. (1991): Viruses in cancers of the head and neck advances in Oto-Rhino-Laryngology. 46, 116-123.
16. de Villiers E.-M. (1992): Hybridization methods other than PCR: an update. *IARC Sci. Publ.*, 111-119.

17. de Villiers E-M. (1993): Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. *In*: Wagener C. and Neumann S. (Eds.): *Molecular Diagnostics of Cancer*. S.65-76. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
18. de Villiers E.-M. (1998): Human papillomavirus infections in skin cancers. Dossier "Virus and Cancer-Part II". *Biomed and Pharmacother* 52, 26-33.
19. Elamin F., Steingrimsdottir H., Wanakulasuriya S., Johnson N., Tavassoli M. (1998): Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncology* 34, 191-197.
20. Fischer M., von Winterfeld F. (2003): Evaluation and application of a broad-spectrum polymerase chain reaction assay for human papillomaviruses in the screening of squamous cell tumours of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 123, 752-758.
21. Fliss D.M., Noble-Topham S.E., McLachlin C.M., Freeman J.L., Noyek A.M., van Nostrand A.W.P., Hartwick R.W.J. (1994): Laryngeal verrucous carcinoma: a clinicopathologic study and detection of human papillomavirus using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 104, 146-153.
22. Fuchs P.G., Pfister H. (1984): Cloning and characterization of papillomavirus type 2c DNA. *Intervirology* 22: 177-180.
23. Fukushima K., Ogura H., Watanabe S., Yabe Y., Masuda Y. (1994): Human papillomavirus type 16 DNA detected by the polymerase chain reaction in non-cancer tissues of the head and neck. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 681, 1-3.
24. Gillison M.L., Koch W.M., Shah K.V. (1999): Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck can-

- cers a sexually transmitted disease? *Current Opinion in Oncology*, 11, 191-199.
25. Gissmann L., Diehl V., Schultz-Coulon H.-J., zur Hausen H. (1982): Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *Journal of Virology.*, 44, 393-40.
 26. Gravitt P.E., Manos M.M. (1992): Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *International Agency for Research on Cancer*, 121-132.
 27. Gregoire L., Arella M., Campione-Piccardo J., Lancaster W.D. (1989): Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2660-2665.
 28. Guiliano D., Ganatra M., Ware J., Parrot J., Daub J., Moran L., Brennecke H., Foster J.M., Supali T., Blaxter M., Scott A.L., Williams S.A., Slatko B.E. (1999): Chemiluminescent detection of sequential DNA hybridizations to high-density, filter-arrayed cDNA libraries: A Subtraction Method for Novel Gene Discovery. *BioTechniques*, 27, 146-152.
 29. Harwood C.A., Spink P.J., Suretheran T., Leigh I.M., de Villiers E.-M., McGregor J.M., Proby C.M., Breuer J. (1999): Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific Method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J. C. Microbiology*, 37, 3545-3555.
 30. IARC Monograph, 64, 1995.
 31. Kleinsasser O. (1963): Über den Krankheitsverlauf bei Epithelhyperplasien der Kehlkopfschleimhaut und die Entstehung von Karzinomen. *Z. Laryngol. Rhinol.* 42, 541-558.

-
32. Labitzke R. (1991): Polymerase Chain Reaction (PCR). In: Bertram S. und H.G.Gassen (Hrsg.): Gen-Technische Methoden. S.301-305. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
 33. Leinmüller R. (2001): Medizinreport: Die Vakzine wird Realität. Humane Papillomviren. Dt. Ärzteblatt Jg 98, 30, 1545-1547.
 34. Lewandowsky F., Lutz W. (1922): Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). Arch. Dermatol. Syph. 141, 193-203.
 35. Lipman D.J., Pearson W.R. (1985): Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441.
 36. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982): Molecular cloning: a laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 88-91.
 37. Manos M.M., Ting Y., Wright D.K., Lewis A.J., Broker T.R., Wolinsky S.M. (1989): The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells 7, 209-214.
 38. McFadyean J., Hobday F. (1898): Note on the experimental "transmission of warts in the dog". J. Comp. Pathol. Ther. 11, 341.
 39. McKaig R.G., Boric R.C., Olshan A.F. (1998): Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. Head Neck 20, 250-265.
 40. Meckelein B. (1991): DNA-Sequenzierung nach Sanger. In: Bertram S. und H.G.Gassen (Hrsg.): Gen-Technische Methoden. S.244–257. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

-
41. Morgan D.W., Abdullah V., Quiney R., Mynt S. (1991): Human papilloma virus and carcinoma of the laryngopharynx. *The J. Laryngol. Otol.* 105, 288-290.
 42. Mounts P., Shah K.V., Kashima H. (1982): Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 5425-5429.
 43. Munger K., Werness B., Dyson N., Phelps W.C., Harlow E., Howley P.M. (1989): Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8: 4099-4105.
 44. Nees M., van Wijngaarden E., Bakos E., Schneider A., Dürst M. (1998): Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. *Oncogene* 16, 2447-2458.
 45. New England Biolabs[®] Inc. (1998) CircumVent[®] Phototope[®] Kit. Instruction Manual Version 3.0 (4/98). Beverly, MA, USA.
 46. Orth G., Jablonska S., Favre M., Croissant O., Jarzabek-Chorzelska M., Rzeska G. (1978): Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8170-8174.
 47. Ostwald C., Müller P., Barten M., Rutsatz K., Sonnenburg M., Milde-Langosch K., Löning T. (1994): Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J. Oral Pathol.* 23, 220-225.
 48. Paz B., Cook N., Odom-Maryon T., Xie Y., Wilczynski S.P. (1997): Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 79, 595-604.

-
49. Pfister H., Fuchs F.G. (1987): Papillomaviruses: Particles, Genome Organisation and Proteins. In: Syrjänen K.J., Gissmann L., Koss L. Papillomavirus and human disease. 1987 Springer. S.4-16.
 50. Pintos J., Franco E.L., Black M.J., Bergeron J., Arella M. (1999): Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer* 85, 1903-1909.
 51. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
 52. Sanger F., Miklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
 53. Schacher S.A., Fuccillo D.A., Gitnick G.L., Sever J.L., Huebner R.J. (1968): Oral administration of attenuated rubella virus vaccine (HPV-77). A negative report. *J. Pediatr.* 72, 255-257.
 54. Schwartz S.R., Yueh B., McDougall J.K., Daling J.R., Schwartz S.M. (2001): Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125, 1-9.
 55. Shamanin V., Glover M., Rausch C., Proby C., Leigh I.M., zur Hausen H., de Villiers E.-M. (1994): Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res.* 54, 4610-4613.
 56. Shope R.E. (1933): Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* 58, 607-624.
 57. Slatko B.E. (1990): Protocols for Manual Dideoxy DNA Sequencing. In: Karam J., Chao L. and Warr G.: *Methods in Nucleic Acids Research*. 83-129. CRC Press. Boca Ratan, Florida.

-
58. Snijders P.J.F., van den Brule A.J.C., Schrijnemakers H.F.J., Snow G., Meijer C.J.L.M., Walboomers J.M.M. (1990): The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology*, 71, 173–181.
 59. Snijders P.J.F., Scholes A.G.M., Hart C.A., Jones A.S., Vaughan E.D., Woolgar J.A., Meijer C.J.L.M., Walboomers J.M.M., Field J.K. (1996): Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int. J. Cancer* 66, 464-469.
 60. Steinberg B., Auborn K. (1993): Papillomaviruses in head and neck disease: Pathophysiology and Possible Regulation. *Journal of Cellular Biochemistry. Supp.* 17, 155-164.
 61. Steinberg B.M., DiLorenzo T.P. (1996): A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 15, 91-112.
 62. Strauss M.J., Shaw E.W., Bunting H., Melnick J.L. (1949): „Crystalline“ virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 72, 46.
 63. Stremlau A., Zenner H.P., Gissmann L., zur Hausen H. (1987): Nachweis und Organisationsstruktur der DNS menschlicher Papillomviren beim Kehlkopf- und Hypopharynxkarzinom. *Laryng. Rhinol. Otol.* 66, 311-315.
 64. Syverton J.T., Berry G.P. (1935): Carcinomas in the cottontail rabbit. Following spontaneous virus papilloma (Shope). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 33, 399-400.
 65. Viac J., Staquet M.J., Miguet M., Chabanon M., Thivolet J. (1978): Specific immunity to human papilloma virus (HPV) in patients with genital warts. *Br. J. Vener. Dis.* 54, 172-175.

-
66. Watts S.L., Brewer E.E., Fry T.L. (1991): Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 71, 701-707.
 67. Wilczynski S., Lin B., Xie Y., Paz B. (1998): Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 152, 145-156.
 68. Woods K.V., Shillitoe E.J., Spitz M.R., Schantz S.P., Adler-Storthz K. (1993): Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* 22, 101-108.
 69. Zur Hausen H. (1977): Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78, 1-30.
 70. Zur Hausen H. (1989): Papillomaviruses in Anogenital Cancer as a Model to Understand the Role of Viruses in Human Cancers. *Cancer Research* 49, 4677-4681.
 71. Zur Hausen H. (1994): Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. *Lancet* 343, 955-957.
 72. Zur Hausen H. and de Villiers E.-M. (1994): Human Papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 427 – 447.
 73. Zur Hausen H. (1998): Papillomviren als Krebserreger. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 58, 291-296.

7 Anhang

PK-Puffer 2X	Tris 0,2 M	4,84 g
	EDTA 0,025 M	1,86 g
	NaCl 0,3 M	3,51 g
	SDS (Natriumdodecylsulfat) 2 %	4,00 g
TE-Puffer 1X	Tris 0,01 M	1,211 g
	EDTA 0.001 M	0,372 g
	pH 8,0	
TBE-Puffer 10X	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	8,3 g
NaAc 3 M	NaAc 49,22 g auf 200 mL Bidest, mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen	
BPB-Farbstoff	Bromphenolblau	0,125 g
	Saccharose	40 g
	SDS 10 %	1 auf 100 mL
Marker II	TE-Puffer 1X	40 µL
	BPB	20 µL
	Marker II	40 µL
Marker VI	TE-Puffer 1X	250 µL
	BPB	50 µL
	Marker VI	50 µL

Elektrophorese Puffer	Tris 2 M	241,8 g
	EDTA 0,05 M	16,6 g
	NaCl 0,25 M	20,5 g
	in 800 mL H ₂ O, mit Essigsäure auf pH 7,8-8,0 einstellen	
Blocking Solution	NaCl 0,012 M	7,3 g
	Na ₂ HPO ₄ 0,017 M	2,41 g
	NaH ₂ PO ₄ 0,008 M	0,96 g
	SDS 5 %	49,89 g
	pH 7,2	
Wash Solution	Blocking Sol. 1:10 verdünnt	
Wash Solution II 10X	Tris-HCl 0,1 M	12,1 g
	NaCl 0,1 M	5,85 g
	MgCl ₂ 0,01 M	2,03 g

8 Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. med. M. Fischer möchte ich für die Stellung des Themas, die Betreuung der Arbeit, das Anlernen in der experimentellen Wissenschaft und vor allem für die besonders wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen danken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau U. Lüddecke für ihre hilfsbereite und engagierte Mitarbeit.

Für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit und die Unterstützung möchte ich Herrn Prof. Dr. med. K. Jahnke danken.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Friederike von Winterfeld
Wohnort	Essen
Geburtstag und -ort	12.11.1972 in Georgsmarienhütte

Schulische Bildung

09/1979 – 07/1983	Albert-Schweitzer-Grundschule Essen
09/1983 – 07/1992	Burggymnasium Essen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1992 – 06/2000	Humanmedizin an der Universität Essen
	03/1995 Physikum
	03/1996 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	08/1998 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	06/2000 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

10/2000 – 03/2002	Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Essen
seit 04/2002	Assistenzärztin der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Essen